

Redukce dusičnanů během přípravy mladiny

Ing. JIŘÍ ŠROGL, Ing. MICHAL KOŘÁN, Plzeňské pivovary, a.s. Plzeň, Doc. Ing. JAROSLAV ČEPIČKA, CSc., Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

665.441

Klíčová slova: *mladina, dusičnany, dusitany, rmutování*

1. ÚVOD

Zatímco organické dusíkaté sloučeniny při výrobě piva byly sledovány v uplynulých několika desítkách let velmi intenzívně, byly způsoby přeměn anorganických sloučenin dusíku na okraji zájmu výzkumníků. V praxi se jedná zejména o změny dusičnanů, které jsou při výrobě piva přítomny ve větším či menším množství v surovinách. Všeobecná rozpustnost dusičnanů je příčinou toho, že se dostávají při výrobě mladiny ze surovin do roztoku téměř kvantitativně. Do popředí zájmu se dostaly dusičnany zejména v posledních patnácti letech [1, 2, 3].

V současné odborné literatuře je otázce přeměn dusičnanů při výrobě piva věnována mimořádná pozornost a dostatek informací lze nalézt jak v naší, tak i v zahraniční odborné literatuře [1, 2, 3].

I když dosud nebylo zjištěno, že by vliv dusičnanů na technologický postup byl negativní, setkáváme se již v dřívějších pracích [4] s upozorněním na negativní vliv dusitanů na průběh kvašení. Dusitany vznikají z dusičnanů poměrně snadno a jsou velmi reaktivní. Jejich působením na sekundární aminy vznikají nitrosaminy, které představují skupinu látek působících v mnohých případech velmi nepříznivě na lidský organismus a některé z nich jsou silnými kancerogeny. Současné znalosti o přeměnách jednotlivých forem kyslíkatých sloučenin dusíku při výrobě piva i při fyziologických procesech v lidském organismu jsou popsány v odborné literatuře [5, 6, 7].

Nejdůležitější reakce dusičnanů, redukce na dusitany, je zapříčiněna mikrobiální činností, a to zejména kontaminující mikroflorou. Bakterie vykazující nitrát-reduktasovou aktivitu

jsou častou součástí mladiny zejména tam, kde se používají tradiční postupy separace kalů na chladicích stocích a při kvašení v otevřených kádích. V prvních údajích, které pojednávají o vzniku nitrosaminů během kvašení [7, 8] se jako odpovědný uvádí mikroorganismus *Obesumbacterium proteus* (*Hafnia protea*), který pevně ulpívá na buněčných stěnách kvasinek a tím se koncentruje na jejich povrchu. V pozdějších pracích se uvádí značný počet dalších mikrobiálních kmenů, které se vyskytují v mladínách a vykazují nitrát - reduktasovou aktivitu [9].

Platí ovšem zcela jednoznačně, že nitrososloučeniny vznikají působením dusitanů a tedy všude tam, kde se redukují dusičnany. Další reakce mohou být různé a zplodinami reakcí může být i amonný ion, který je pivovarskými kvasinkami využíván, a dokonce i plynný dusík nebo oxidy dusíku, které unikají z kvasící mladiny s vyvíjeným oxidem uhličitým.

V letech 1989 až 1990 jsme namátkou zjišťovali nezávadnost množství dusitanů při výrobě mladiny, ale také již ve sladině. Tato skutečnost svědčí o tom, že existuje alternativní způsob redukce dusičnanů, který se uplatňuje již při rmutování.

V roce 1991 byla na kongresu EBC zveřejněna práce Smithe [10], který zjistil vznik dusitanů během rmutování. Uvádí, že redukce dusičnanů je v tomto případě způsobena speciálním kmenem *Bacillus species*. Zjistil dále, že redukce dusičnanů má poměrně ostré teplotní maximum při 55 °C, reakce však probíhá ještě při 70 °C, i když v nepatrné míře.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Ve třech závodech Plzeňských pivovarů označených A, B a C jsme provedli několik sérií pokusných várek v provozním

Tabulka 1. Obsah dusičnanů a dusitanů v provozních srovnávacích a pokusných várkách pivovaru A

Způsob rmutování	Sladina			Mladina			
	Obsah dusičnanů (mg/l)	Obsah dusitanů (mg/l)	(% i)	Obsah dusičnanů (mg/l)	Obsah dusitanů (mg/l)	i (%)	Extrakt pův. mladiny (% hm.)
1. série provozních várek							
3-rmut.	-	0,3	-	-	-	-	-
2-rmut.	-	1,3	-	-	-	-	-
3-rmut.	-	-	-	41,0	0,8	2,0	11,4
2-rmut.	-	-	-	34,0	2,4	7,1	11,6
3-rmut.	-	-	-	54,3	0,3	0,6	11,6
3-rmut.	-	-	-	41,4	0,6	1,4	11,5
2-rmut.	-	-	-	36,0	2,1	5,8	11,8
2-rmut.	-	-	-	46,1	1,0	2,2	11,6
3-rmut.	-	-	-	47,3	0,2	0,4	11,5
2-rmut.	-	-	-	42,6	0,5	1,2	11,3
3-rmut.	-	-	-	54,4	0,4	0,7	11,8
2-rmut.	27,8	-	-	52,8	1,3	2,5	11,7
2-rmut.	27,5	-	-	43,2	2,0	4,6	11,5
2. série provozních várek							
3-rmut.	-	0,6	-	-	0,8	-	11,2
3-rmut. ¹	-	0,2	-	-	0,1	-	11,6
3-rmut. ²	-	0,5	-	-	0,6	-	11,5
3. série provozních várek							
3-rmut.	27,3	0,3	1,1	51,2	0,3	0,6	11,6
3-rmut. ³	28,1	0,6	2,1	53,4	0,2	0,4	11,6
3-rmut. ⁴	24,5	1,0	4,1	54,0	0,9	0,7	11,7
4. série provozních várek							
3-rmut.	41,1	0,9	2,2	66,1	0,4	0,6	-
3-rmut. ⁵	45,0	0,7	1,6	71,7	0,4	0,4	-

Poznámky:

- 1 - třířmut. s prodlouženou prodlevou na kádi při 54 °C o 30 min
- 2 - třířmut. s prodlouženou prodlevou na kádi při 63 °C o 30 min
- 3 - třířmut. s prodlouženou prodlevou na kádi při 50 °C o 30 min
- 4 - třířmut. s prodlouženou prodlevou na kádi při 60 °C o 30 min
- 5 - třířmut. s prodlouženou prodlevou na kádi při 62 °C o 20 min

i - konverzní index

měřítka, v nichž jsme sledovali vliv různých podmínek rmutování na redukci dusičnanů během technologického postupu.

Pivovar A používá dvounádobové měděné varní soupravy s přímým ohřevem plynem s objemem rmutovacího i mladiny kotle 230 hl. Průměrný obsah dusičnanů ve varní vodě byl 29,3 mg/l, v používaném žateckém chmelu 10,76 g/kg a v jednosložkovém chmelovém extraktu 0,66 g/kg. Dávkování na výhradně 12 % várku bylo vždy 44 kg žateckého chmele a 1 kg jednosložkového extraktu.

Pivovar B má čtyřnádobovou měděnou varní soupravu s nepřímým ohřevem párou a s objemem rmutovacího kotle 180 hl a mladiny kotle 360 hl. Průměrný obsah dusičnanů ve varní vodě činil pouze 5,7 mg/l a obsah dusičnanů v použitém jednosložkovém extraktu byl 0,66 g/kg a ve dvousložkovém extraktu 12,47 g/kg. Dávkování na sledované 10 % várky bylo vždy 25 kg žateckého chmelu a 5 kg dvousložkového chmelového extraktu.

Pivovar C používá 2 čtyřnádobové nerezové varní soupravy s nepřímým ohřevem párou o objemu rmutovacího kotle 120 hl a mladiny kotle 380 hl a dále 2 nerezové spádové varny o objemu rmutovacího kotle 150 hl a mladiny kotle 400 hl. Průměrný obsah dusičnanů ve varní vodě činil 24,2 mg/l. Obsah dusičnanů v použitých chmelech a dvousložkovém chmelovém extraktu byl stejný jako u pivovarů A a B. Dávkování chmele činilo u 10% várek 23 kg žateckého chmele, 6 kg čínského chmele a 5 kg dvousložkového chmelového extraktu. Dávkování chmele u 12% várek sestávalo pouze z 61 kg žateckého chmele a 6 kg čínského chmele.

Stanovení dusičnanů a dusitanů v surovinách, sladidě a mladidě fotometricky po reakci s kyselinou sulfanilovou a 1-naftylaminem bylo prováděno metodou popsanou Postelem [2].

2.1 Výsledky a jejich diskuse

Sledovali jsme obsah dusičnanů a jeho změny v průběhu varního procesu. Případný vliv způsobu rmutování na obsah dusičnanů jsme zjišťovali tak, že jsme prováděli pokusné provozní várky s upraveným způsobem rmutování. Vždy ve stejném časovém úseku jsme odebírali vzorky jak z várky pokusné, tak i z várky srovnávací s nezměněným způsobem rmutování. U většiny várek jsme stanovili obsah dusičnanů a dusitanů ve sladidě a mladidě. Pro posouzení míry přeměny dusičnanů na dusitany jsme zavedli konverzní index charakterizující podíl dusičnanů zredukovaných na dusitany:

$$i = \frac{\text{obsah dusitanů (mg/l)}}{\text{obsah dusičnanů (mg/l)}} \cdot 100$$

Pivovar A

V pivovaru A s běžně užívaným třímutovým způsobem přípravy sladiny jsme provedli 4 série provozních pokusů. V 1. sérii jsme k srovnávacím třímutovým várkám prováděli pokusné dvourmutové várky, v 2. sérii pokusné třímutové várky s prodlouženou teplotní prodlevou při 54 °C o 30 min., ve 3. sérii pokusné třímutové várky s prodlouženou teplotní prodlevou při 50 °C a 60 °C a ve 4. sérii třímutovou várku s prodlouženou teplotní prodlevou při 62 °C. Výsledky sledování obsahu dusičnanů a dusitanů v sladidě a mladidě jsou uvedeny v tabulce 1.

V tomto pivovaru jsme prováděli největší počet provozních pokusů, ze kterých vyplynuly důležité poznatky. Obsah dusičnanů v mladidě pivovaru A byl ovlivněn jednak hladinou dusičnanů ve varní vodě, jednak poměrně velkou dávkou žateckého chmele s vysokým obsahem dusičnanů. Jejich obsah v mladidě se pohyboval v rozsahu 34,0 až 71,4 mg/l, přičemž u dvourmutových várek byl nižší, v průměru 42,45 mg/l, kdežto u třímutových várek vyšší, v průměru 53,48 mg/l. Vliv tepelných prodlev (okolo 50 a 60 °C) při rmutování se vzhledem k menšímu počtu experimentálních údajů výrazně neprojevil. Zcela podle očekávání byl zjištěn nárůst hladiny dusičnanů mezi sladinou a mladinou, vzhledem k vysoké dávce chmelu hlávkovým chmelem.

Obsah dusitanů v mladidě pivovaru A kolísal v relativně širším rozmezí od 0,1 do 2,4 mg/l, ale na podstatně nižší úrovni. Na rozdíl od dusičnanů byl většinou vyšší obsah dusitanů u dvourmutových várek, kde podíl celkového rmutu vystaveného varu je nižší než u třímutových várek. Prodloužení doby varu má vždy za následek inaktivaci enzymů, tedy i snížení případné nitrát-reduktační aktivity. Prodloužení prodlevy při teplotách od 50 °C do 63 °C většinou vedlo k mírnému zvýšení tvorby dusitanů. Obdobně se ve většině případů snížil obsah dusitanů v mladidě oproti obsahu ve sladidě následkem jednak dvouhodinového chmelovaru, jednak následkem adsorpce na vyloučené kaly. Index konverze dusičnanů na dusitany byl v souladu s tím u várek 3. a 4. série podstatně vyšší u sladiny než u mladiny.

Výsledky provozních pokusných a srovnávacích várek v pivovaru A ukázaly, že redukce dusičnanů během rmutování není pravidelná, její intenzita se u jednotlivých várek navzájem liší. Obsah dusitanů je většinou vyšší u mladiny vyrobených dvourmutovým postupem. Prodloužením teplotní prodlevy na kádi při 55 °C se obsah dusitanů mění pouze málo nebo se nemění vůbec, kdežto prodloužením teplotní prodlevy při 63 °C se obsah dusitanů většinou zvyšuje.

Z uvedených poznatků lze usoudit, že pokud je intenzita redukce při rmutování mikrobiologického původu, způsobuje ji jiný mikroorganismus než popisuje Smith [10]. Při dvourmutovém varním postupu jde zřejmě o působení teplot 62 °C až 65 °C, které jsou při tomto způsobu výrazně delší.

Pivovar B

Pivovar používá pro výrobu mladiny dvourmutový způsob. Zvláštností je zde velmi nízký obsah dusičnanů ve vodě a v suro-

Tabulka 2. Obsah dusičnanů a dusitanů v provozních srovnávacích a pokusných várkách pivovaru B

Způsob rmutování	Sladina			Mladina			
	Obsah dusičnanů (mg/l)	Obsah dusitanů (mg/l)	(% i)	Obsah dusičnanů (mg/l)	Obsah dusitanů (mg/l)	i (%)	Extrakt pův. mladiny (% hm.)
2-rmut.	-	-	-	13,5	0,4	3,0	9,6
2-rmut.	3,6	1,0	27,8	-	-	-	-
1-rmut.	3,2	1,2	37,5	12,9	0,2	1,6	9,5
infúze	6,5	0,6	9,2	13,3	0,2	1,5	9,5

Tabulka 3. Obsah dusičnanů a dusitanů v provozních srovnávacích a pokusných várkách pivovaru C

Způsob rmutování	Sladina			Mladina			
	Obsah dusičnanů (mg/l)	Obsah dusitanů (mg/l)	(% i)	Obsah dusičnanů (mg/l)	Obsah dusitanů (mg/l)	i (%)	Extrakt pův. mladiny (% hm.)
1. série provozních várek							
2-rmut.	-	-	-	24,3	0,1	0,4	12,0
3-rmut.	-	-	-	48,0	0,2	0,4	12,1
2-rmut.	24,2	-	-	-	0,5	-	12,1
3-rmut.	21,1	-	-	-	0,2	-	12,1
2. série provozních várek							
2-rmut.	24,9	2,7	10,8	22,1	1,5	6,8	10,0
1-rmut.	-	0,4	-	-	1,4	-	-
1-rmut.	23,8	0,1	0,4	33,3	0,8	2,4	10,1
1-rmut.	-	0,3	-	-	0,9	-	10,2
3. série provozních várek							
2-rmut.	-	-	-	16,3	1,2	7,4	10,0
infúze	-	-	-	21,5	4,1	19,1	10,2

vinách a tím i jejich nízký obsah ve sladínách a mladínách. Provedli jsme zde jednu sérii provozních pokusů ve které bylo odzkoušeno jednormutové a infúzní rmutování. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Celková hladina dusičnanů v mladínách pivovaru B se pohybovala v rozsahu 12,9 až 13,5 mg/l. Ve sladínách byl zjištěn zvýšený obsah dusičnanů u infúzní várky ve srovnání s várkou dvourmutovou a třířmutovou. Rozdíl obsahu dusičnanů mezi sladinou a mladinou je rovnoměrný a koreluje s množstvím dusičnanů dodaných chmelem a chmelovým extraktem.

Obsah dusitanů je u sladín a mladín pivovaru B relativně vysoký i přes výchozí relativně nízkou hladinu dusičnanů. Z toho důvodu byl zjištěn i vysoký index konverze u sladín, kdežto u mladín se snížil na hodnoty obvyklé i u ostatních dvou pivovarů. To svědčí o skutečnosti, že během rmutování mohou vznikat relativně velké podíly dusitanů i při nízkých hladinách dusičnanů ve sladíně a mladině.

Pivovar C

Ve varně se běžně používá dvourmutový varní postup, který jsme v každé ze 3 sérií pokusů považovali za srovnávací. Kromě třířmutového postupu jsme sledovali též jednormutový a infúzní postup. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Obsah dusičnanů v mladínách 10% a 12% várek pivovaru C byl nižší oproti pivovaru A vzhledem k nižší dávce chmelu a pohyboval se v rozsahu 16,3 až 48,0 mg/l. Obsah dusičnanů ve sladínách se pohyboval v rozsahu 21,1 až 24,9 mg/l. Vliv způsobu rmutování se na obsahu dusičnanů ve sladíně a v mladině prokazatelně neprojevil. Zjištěné hodnoty konverzního indexu přeměny dusičnanů na dusitany kolísaly v širokém rozsahu od 0,1 až do 19,1 %. V průměru byl konverzní index u sladín a mladín vyšší pro 10% várky než pro 12% várky. U mladiny mírně klesal zhruba v řadě třířmutová, dvourmutová, jednormutová a infúzní várka. Ke zřetelně nejvyšší konverzi dusičnanů na dusitany došlo při infúzním rmutovacím postupu, kde byl ve srovnání s ostatními várkami z tohoto pivovaru zjištěn i vysoký i konverzní index.

Výsledky našich pokusů potvrzují, že během rmutování může docházet k redukci dusičnanů na dusitany. Intenzita redukce je

značně proměnlivá a jsou značné rozdíly mezi jednotlivými várkami. Mechanismus vzniku dusitanů není jednoznačně objasněn. Jde-li o redukci dusičnanů způsobenou mikroorganismy obsaženými již ve sladu, je odstranění příčin velmi obtížné.

V literatuře popsány kmeny sporulujícího mikroorganismu [10] vykazuje poněkud jiné vlastnosti, než se zjistilo při našich pokusech - projevuje se to v odlišných teplotách, při kterých je redukce dusičnanů nejvýraznější. Smith [10] uvádí maximum tvorby dusitanů při 55 °C, v našich podmínkách jsme nejvyšší nárůst dusitanů zaznamenali při teplotách nad 60 °C (při "nižší cukrotvorné" teplotě).

Svá pozorování jsme prováděli vesměs na provozních várkách. Při takovéto koncepci pokusných várek se však nelze vyhnout značné variabilitě použitých surovin i výsledků. Každou experimentální várku jsem srovnal se současně prováděnou várkou nebo várkou následující, aby se vliv surovin projevil co nejméně. Nejvíce pokusů jsme provedli v pivovaru A, jejich výsledky mají proto nejvyšší statistický význam. Při hodnocení jsme zavedli bezrozměrný konverzní index *i*. Zde je nutno připomenout, že jde vždy o zjištění stavu v daném okamžiku. Reaktivita dusitanového iontu způsobuje jisté snížení výpovědní hodnoty jeho stanovení, to však má při stejném způsobu provádění analýz statisticky zhodnotitelný význam a při důsledném paralelním provádění analýz srovnávacích várek se sledované rozdílné vlivy projeví.

3. ZÁVĚR

Z výsledků sledování obsahu dusičnanů a dusitanů ve sladínách a mladínách v celkem 35 provozních várkách tří pivovarů vyplynulo, že během rmutování může docházet v různé míře k redukci dusičnanů na vznik dusitanů. Různé postupy rmutování způsobují rozdílnou redukci dusičnanů, ve většině případů je redukce intenzivnější u dvourmutového postupu než u postupu třířmutového. Na vznik dusitanů z dusičnanů může mít vliv i zvýšení teplotní prodlevy při rmutování. Intenzita redukce dusičnanů nezávisí v rozhodující míře pouze na jejich obsahu v surovinách, ale i při jejich relativně nízké koncentraci mohou být intenzivně přeměňovány na dusitany.

LITERATURA

1. CERUTTI, G., VECCHIO, A., FINOLI, C.: Mschr. f. Brauwis., 36, 1983, s. 217
2. POSTEL, W.: Brauwissenschaft, 29, 1976, s. 39
3. ČEPIČKA, J., BAUDYŠ, P., VÍZNEROVÁ, E., KRAUSOVÁ, J.: Kvasný prům., 37, 1991, s. 230
4. ŠAVAL, J., PROKOPOVÁ, M., ŠATAVA, J., Kvasný prům., 22, 1976, s. 268
5. SCHUR, F.: Brau. Rdsch., 99, 1988, s. 89
6. SCHILD, E., DIEMER, H.: Brauwis., 15, 1962, s. 125
7. WEINER, R. C., RALPH, D. J., TAYLOR, L.: Proc. EBC Congr., Nice 1975, s. 565
8. MASSEY, R. C., KEY, P. E., Mc WEENY, KNOWLES, M. E.: Proc. of International Symposium on N-Nitroso Compounds, Baden 1986, s. 219
9. KARA, B. V., GODBER, S., HAMMOND, J.: Proc. EBC Congr., Madrid 1987, s. 663
10. SMITH, N. A.: Proc. EBC Congr., Lisbon 1991, s. 561
11. FORSTER, A.: Brauwelt, 128, 1988, s. 188

Lektorovala prof. Ing. G. Basařová, DrSc.

Šrogl, J. - Kořán, M. - Čepička, J.: Redukce dusičnanů během přípravy mladiny. Kvas. prům., 38, 1992, č. 7, s. 200 - 204.

Sledování obsahu dusičnanů a dusitanů během rmutovacího procesu a při chmelovaru u 35 várek tří pivovarů prokázalo různý stupeň redukce dusičnanů na dusitany. Průměrný index konverze dusičnanů na dusitany činil u sladiny 9,7 %, kdežto u mladiny pouze 2,8 %. Redukce dusičnanů na dusitany byla intenzivnější u dvourmutového než u třirmutového postupu a byla dále ovlivněna délkou teplotních prodlév při rmutování. K redukci docházelo i při relativně nízkých koncentracích dusičnanů ve výchozích surovinách.

Шрогл, Я. - Коржан, М. - Чепичка, Я.: Восстановление нитратов в процессе получения охмеленного сусла. Квас. прум., 38, 1992, № 7, стр. 200 - 204

Исследование содержания нитратов и нитритов в процессе затирания и при варке хмеля показало для 35 варок трех пивоваренных заводов разную степень восстановления нитратов в нитриты. Средний индекс превращения нитратов в нитриты для охмеленного сусла составлял 9,7 %, а для сусла только 2,8 %. Восстановление нитратов в нитриты было более интенсивное в случае двойного чем тройного затирания и далее подвергалось влиянию длины выдержки температуры при затирании. Восстановление происходило и при относительно низких концентрациях нитратов в исходном сыре.

Šrogl, J. - Kořán, M. - Čepička, J.: Nitrate Reduction During Wort Preparation. Kvas. prům., 38, 1992, No. 7, pp 200 - 204

The determination of nitrate and nitrite levels during the mashing process and the hop boiling with 35 batches from three breweries showed a different degree of nitrate reduction to nitrites. The average index of that conversion was 9.7 % with sweet worts but only 2.8 % with hopped worts. The nitrate reduction to nitrites was higher with a two-stage mashing than with a three-stage one. The reduction was further affected by the temperature holding during mashing. The reduction was observed with relatively low nitrate concentrations in raw materials, as well.

Šrogl, J. - Kořán, M. - Čepička, J.: Reduktion der Nitrate im Verlauf der Würzeherstellung. Kvas. prům., 38, 1992, Nr. 7, S. 200 - 204.

Die Verfolgung des Nitrate- und Nitritegehalts während des Maischprozesses und des Hopfenkochens bei 35 Suden in drei Brauereien hat die unterschiedliche Intensität der Reduktion der Nitrate zu Nitriten erwiesen. Der durchschnittliche Index der Konversion der Nitrate zu Nitriten betrug bei den ungehopften Würzen 9,7 %, bei den Würzen jedoch nur 2,8 %. Die Reduktion der Nitrate zu Nitriten war bei dem Zweimaischverfahren intensiver als bei dem Dreimaischverfahren und sie wurde weiter durch die Länge der Temperatur-Rasten bei dem Maischen beeinflusst. Die Reduktion fand auch bei relativ niedrigen Konzentrationen der Nitrate in den Ausgangsrohstoffen statt.